

***Streptococcus mutans* spesifisten bakteriofagien eristäminen**

Sini Karvonen

Hammaslääketieteen kandidaatti

Hammaslääketieteenlaitos

Helsinki 19.6.2019

Tutkielma

sini.karvonen@helsinki.fi

Ohjaaja: Saija Kiljunen, dos.

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Tiedekunta - Fakultet - Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma - Utbildningsprogram - Degree Programme Hammaslääketieteen laitos	
Tekijä - Författare - Author Sini Karvonen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title <i>Streptococcus mutans</i> spesifisten bakteriofagien eristäminen			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Hammaslääketiede			
Työn laji - Arbetets art - Level Syventävä tutkielma	Aika - Datum - Month and year 19.06.2019	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 24 + 6	
Tiivistelmä - Referat - Abstract			
<p>Suun mikrobiston bakteereista <i>Streptococcus mutans</i> on erityisen haitallinen aiheuttaen hammaskariesta. Tutkimukseni tavoitteena oli <i>S. mutans</i> spesifisten bakteriofagien eristäminen. Tutkimuksessa selvitettiin, löytyykö uusia faageja ja voidaanko niitä tulevaisuudessa käyttää faagiterapiassa kariesbakteerien hävittämiseen potilaista. Työ toteutettiin osana Helsingin yliopiston suurempaa bakteriofagitutkimusta, jonka lopputavoitteena on tuottaa uusia hoitomuotoja bakteeri-infektioiden hoitoon. Uudet hoitomuodot bakteeri-infektioissa ovat kasvavan tutkimuksen alla antibioottien tehon heikentyessä ja resistenttiyden lisääntyessä bakteerien keskuudessa.</p> <p>Tutkimus tehtiin yleisiä laboratoriotyöohjeita noudattaen bakteriofagien löytämiseksi. Tutkimuksessa käytettiin Hammaslääketieteenlaitokselta saatuja kantoja (Grönroos et al. 1998) sekä HUSLABista kerättyjä potilaskantoja. Tutkimukseni näyttemateriaaleina käytettiin kaupallista bakteriofagiseosta, jätevesinäytteitä sekä sylkinäytteitä. Faageja etsittiin kaksikerrosmaljalta niin sanotulla Drop test- menetelmällä. Bakteriofagit voidaan eristää maljalla näkyvältä bakteerivapaalta alueelta tarkempaa tutkimusta varten.</p> <p>Suomen faagiterapiahanke on vasta alkuvaiheessa. <i>Streptococcus mutansia</i> infektoivia bakteriofageja ei löydetty tutkimukseni aikana yhdestäkään näyttemateriaalista, joten soveltuvuutta faagiterapiaan ei voitu tutkia. Tästä syystä tutkimukseni toisessa vaiheessa yritettiin eristää myös uusia <i>S. mutans</i> kantoja vapaaehtoisten koehenkilöiden syljestä spesifisten kasvatusalustojen avulla. Ajan saatossa muuntuneet faagikannat voivat infektoida nykyisin esiintyviä bakteerikantoja vanhojen sijaan. Tutkimukseni aikana saatiin eristettyä 10 uutta <i>S. mutans</i> kantaa. Kaikkiaan <i>S. mutans</i> bakteriofageja on tieteellisten julkaisujen ja tietokantojen perusteella löydetty hyvin vähän tähän mennessä. Tutkimukseni tulos bakteriofagien osalta noudattaa siis aiempien tutkimusten linjaa.</p>			

Jatkossa näytemääriä lisäämällä positiivisen faagilöydöksen todennäköisyys saattaisi kasvaa.

(199 sanaa)

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Streptococcus mutans; Bacteriophage; Phage; Dental Caries/prevention

Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors

Saija Kiljunen, dos.

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Terkko ja Helda.

Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
2	Kirjallisuuskatsaus.....	2
2.1	<i>Streptococcus mutans</i>	2
2.2	Bakteriofagit	3
2.3	Taistelu <i>Streptococcus mutansia</i> vastaan.....	5
2.4	Faagiterapia.....	5
3	Tutkimuksen tavoitteet	8
4	Tutkimusaineisto ja menetelmät.....	8
4.1	Tutkimusaineisto.....	9
4.2	Tutkimusmenetelmät	10
5	Tulokset	15
5.1	Faagieristyksen tulokset.....	15
5.2	Uusien <i>Streptococcus mutans</i> kantojen eristäminen.....	18
6	Pohdinta.....	19
7	Johtopäätökset ja yhteenveto	21
8	Kiitokset	22
	Lähdeluettelo	23
	Liitteet	

1 Johdanto

Yleinen suun mikrobisto koostuu monista bakteereista, joista *Streptococcus mutans* on todettu yhdeksi kariksen suurimmista aiheuttajista. Tartunta voidaan saada jo lapsena syljen välityksellä aikuisen suusta joko saman lusikan, tutin tai sylkikontaktin välityksellä. (1) Bakteriston valtalajit kehittyvät jo lapsen ensimmäisten elinvuosien aikana, ja tällöin *S. mutans* tartunta on haitallisin suun hyvinvointia ajatellen (2). Tartuntaa estävät hoitavien aikuisten hyvä suuhygienia sekä tartunnan tietoinen välttäminen syöttämisen yhteydessä sekä muussa toiminnassa (3).

Karies on suuri kansanterveydellinen ongelma etenkin länsimaisessa yhteiskunnassa, joten se on myös kansantaloudellisesti merkittävä rasite (1,4). Kappale kaksi esittelee aiheeseen liittyviä aiempia julkaisuja sekä erilaisia näkökulmia. Tutkimukseni tavoitteena oli etsiä lisää *S. mutans* -bakteeria infektoivia bakteriofageja ja raportoida laboratoriossa saaduista tuloksista. Mielenkiintoiseksi aiheen tekee se, että mikäli tarkoitukseen sopivia faageja löydetään, päästään niitä tulevaisuudessa kehittämään edelleen kliiniseen lääketieteeseen sopiviksi. Bakteriofageja etsitään käytettäväksi myöhemmin perustettavassa Helsingin faagiterapialaboratoriossa. Työssä käytettyihin menetelmiin perehdytään tarkemmin neljännessä kappaleessa. Tutkimus päättyy kappaleessa viisi esitettyjen laboratoriotulosten tarkasteluun sekä mahdollisten jatkotoimien esittelyyn ja pohdintaan.

Projekti toteutettiin kesällä 2018, osana suurempaa Helsingin yliopiston bakteriofagitutkimusta, jonka lopputavoitteena on tuottaa uusia hoitomuotoja bakteeri-infektioiden hoitoon. Bakteriofagitutkimus on lisääntyvän mielenkiinnon kohteena nykyisten mikrobilääkkeiden tehon heikentyessä antibioottiresistenttien kantojen lisääntyessä. (5) Koska tutkimus *S. mutansin* osalta on vasta alussa, ei töiden tuloksesta voitu etukäteen tietää. Työn kuva sekä menetelmät muokkautuivat ja kehittyivät kokemusten ja saatujen tulosten perusteella läpi koko työvaiheen. Bakteriofagien löytäminen osoittautui oletettua vaikeammaksi, ja siitä syystä tulokset eivät vastanneet toivottua.

2 Kirjallisuuskatsaus

Suun mikrobisto on ollut tutkimuksen aiheena hyvin pitkään, sillä lähes sata vuotta sitten esitettiin ensimmäisiä arvioita siitä, että *S. mutans* olisi eräs kariuksen aiheuttaja. Kuitenkin vasta 1960-luvulla saatiin merkittävä yhteys kariuksen ja *S. mutansin* välille todistettua. (4) Merkittävä tutkimus erilaisista *S. mutansin* tyypeistä tehtiin viime vuonna Ruotsissa, kun paljastui, että itse bakteerin alatyypillä onkin suuri vaikutus siihen, kuinka helposti bakteeri voi muodostaa kariesta hampaan pinnalle. Tutkimuksessa on myös esitetty elintapojen ja suun kemiallisen koostumuksen vaikuttavan kariuksen syntyyn (1). Jo aiemmissa tutkimuksissa Helsingissä on osoitettu, että mutasiinia enemmän tuottavat kannat saattavat tarttua herkemmin äidiltä lapselle (6). Vaikka *Streptococcus* -lajeja onkin useasti havaittu kariesta aiheuttavien mikrobien joukossa, on nyt noussut tutkimusaiheeksi ja todennäköisemmäksi syyksi kokonaisvaltainen suun mikrobikoostumus kariuksen riskitekijänä (7,8).

2.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans on ihmisen suun mikrobistoon kuuluva bakteeri. Se kuuluu nimensä mukaisesti pyöreänmallisiin kokkibakteereihin, jotka normaalisti muodostavat yhteen liittyneinä lyhyitä tai keskipitkiä ketjumaisia muodostelmia. *S. mutans* värjäytyy Gram-positiivisesti ja kykenee muodostamaan biofilmiä kasvupinnalleen. (4) Solunulkoinen matriksi, jota solut tuottavat biofilmin pinnalle, estää jossakin määrin bakteriofagien sekä antibioottien vaikutukset. Biofilmi lisää suussa elävien bakteerien sietokykyä erilaisia ympäristötekijöiden muutoksia ja isäntäelimistön puolustusmekanismeja vastaan. (4,9)

Suurin osa streptokokeista on fakultatiivisesti anaerobeja, eli ne sietävät myös hapellisia elinympäristöjä, vaikka suosivat anaerobisia oloja. Suussa *S. mutans* muuntaa entsyymaattisesti sokerista maitohappoa. Maitohapon takia biofilmin alla oleva hampaan pinta demineralisoituu. Hampaan kiilteen vaurio aiheuttaa korjautumattoman hammaskudoksen menetyksen (3). Mikäli bakteerit saavat jatkaa toimintaansa hampaan

pinnalla, lopulta koko hammas voi tuhoutua ja vaikuttaa kivun sekä toiminnan menetyksen kautta henkilön elämänlaatuun. Bakterilla on erilaisia geno- ja fenotyyppijä, joiden infektiivisyyden on tutkittu vaihtelevan suuresti eri alatyypin adheesiokyvyn sekä muiden ominaisuuksien mukaan. (1,4)

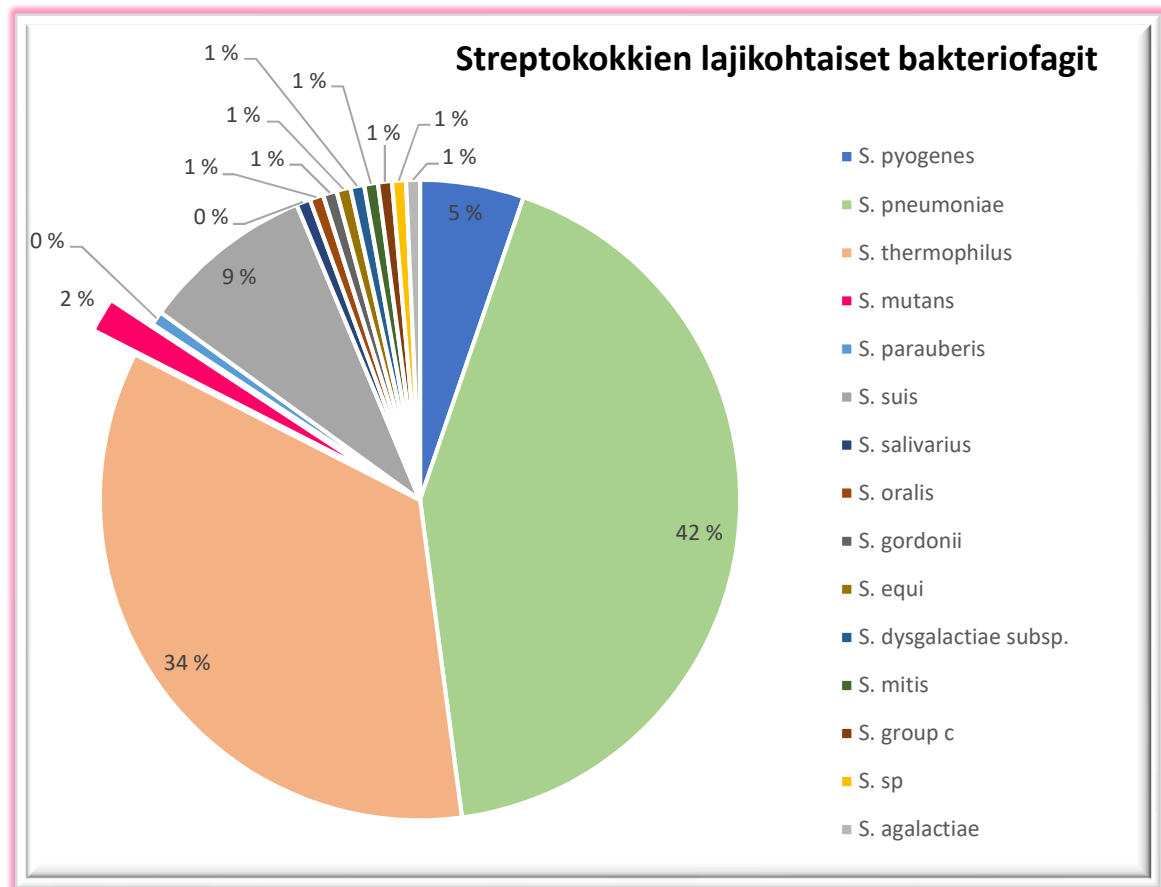
2.2 Bakteriofagit

Bakteriofagit eli faagit, ovat bakteereita infektoivia viruksia. Nämä virukset ovat hyvin lajispesifejä ja infektoivat siis ainoastaan tiettyä bakteerilajia tai -kanta. Bakteriofagi tarttuu häntäproteiininsa avulla isäntäsolunsa pinnalla oleviin proteiineihin. Bakterin pinnalla olevien proteiinien sekä hiilihydraatti- ja rasvaketjujen koostumus vaihtelee suurestikin eri lajien välillä. Tästä seuraa faagien isäntäspesifisyys. Bakteriofagin tartuttua isäntäänsä se työntää oman genominsa isäntäsolun sisään. Isäntäsolun aineenvaihduntakoneisto alkaa monistaa faagin genomia ja uudet itsenäisesti pakkautuvat faagit pääsevät vapauduttuaan infektoimaan lisää soluja. (10)

Bakteriofageja on tutkittu jo paljon, sillä faagiterapia on nopeasti kehittyvä ja tutkijoita kiinnostava ala. Etenkin eläinkokeita on käytetty faagitutkimuksessa (10). Bakteriofageilla voidaan tappaa kaikenlaisia bakteereja, ja koska faagit ovat usein spesifisiä tietylle bakteerille, niiden käyttö kliinisessä lääketieteessä on suuren mielenkiinnon ja kehityksen kohteena. Tällä hetkellä faagiterapiaa käytetään kokeellisena hoitomenetelmänä mm. ihoinfektioiden hoidossa. Bakteriofageille mikrobi ei voi kehittää resistenssiä yhtä helposti kuin antibiootille. Bakteriofageilla on kyky muuntaa genomiaan kuten muillakin viruksilla, ja siten pystyvät taas infektoimaan muuntuneen bakteerikannan. (5)

Streptokokkeja infektoivia viruksiakin on löydetty jo satoja. Suurin osa näistä faageista on *Caudovirales* suvun *Siphoviridae* viruksia. Niiden geneettinen informaatio on DNA-kaksoisketjun muodossa eikä niillä ole havaittu RNA vaiheita. Ylivoimaisesti suurin osa tietokannasta löytyvistä streptokokkien faageista on löydetty *S. thermophilus* tai

S. pneumoniae -lajin bakteereista. Alla olevassa ympyräkaaviossa (kuva 1) on esitetty tietokannasta löytyvien faagien suhteet dokumentoidun isäntälajin mukaan. (11)



Kuva 1. *Streptococcus* suvun bakteriofagien isäntälajien osuudet genomitietokantaan ilmoitetuista faageista. (11)

On hyvä huomata, että streptokokkien faagit eivät automaattisesti infektoi kaikkia suvun bakteereita, vaan ovat usein spesifisiä infektoimaan ainoastaan tietyn lajin streptokokkeja. (11) Bakterisuvun sisällä osa lajeista saattaa olla geneettisesti yhtenäisempiä ja tämä voi mahdollistaa faagien tartunnan lajien välillä.

2.3 Taistelu *Streptococcus mutansia* vastaan

Ihmisilläkin on kokeiltu *Streptococcus mutansia* vastaan kehitettyä rokotetta. Rokotteesta on kuitenkin Tenovuon mukaan luovuttu, sillä vasta-aineiden vaikutuksia sydämen ja muiden sisäelinten toimintaan ei ole pystytty tutkimaan perusteellisesti. (3,8) Myös ruotsalainen tutkimusryhmä ottaa esiin rokotteen mahdollisuuden kariesta vastaan (1). Uusimpien tutkimusten valossa rokotteen tehosta kuitenkin kiistellään, kun valloillaan on uusi käsitys kariksen muodostumisesta pikemminkin suun mikrobiomin kuin yksittäisen bakteerin aiheuttamana (8). Herzberg ja Costalonga puolestaan esittävät tutkimuksessaan, että rokotuksen todennäköisyys on pieni, sillä kariksen aiheuttamien kuolemien määrä on hyvin vähäinen ja siten tautia ei pidetä erityisen vaarallisena (7).

Vasta-aineisiin perustuvien rokotteiden heikkoutena on myös niiden kokonaisvaltainen ja arvaamaton toiminta elimistössä. (3) Voidaanko faagiterapialla sitten saada ratkaisu tähän ongelmaan? Faagit ovat spesifisiä tietyille bakteerisuvuille tai lajeille, eivätkä ne vaikuta elimistön muiden bakteerien toimintaan. Näin ollen niiden käyttö rajautuisi ainoastaan bakteeri-infektion alueelle. (5) Karieksesta puhuttaessa on muistettava, että tuhottavat mikrobit muodostavat biofilmin hampaan pinnalle. Azerendo ja Sutherland ovat kuitenkin tutkimuksessaan todenneet, että bakteriofagit voivat tunkeutua myös biofilmiin, eikä tämä ole esteenä niiden tehokkaalle toiminnalle (12).

2.4 Faagiterapia

Faagiterapia tarkoittaa infektioiden hoitoa infektion aiheuttamille bakteereille spesifisillä bakteriofageilla. Faageilla on kaksi erilaista elinkiertoa: lyyttinen tai lysogeeninen. Faagiterapiaan voidaan valikoida näistä ainoastaan lyyttisen elämänsyklin omaavia faageja, sillä niiden infektoimat bakteerisolut hajoavat täysin faagien vapautuessa ympäristöönsä. Lyyttiset bakteriofagit siis tuhoavat isäntäsolunsa toisin kuin lysogeeniset faagit, joiden genomi saattaa liittyä osaksi isäntäsolun genomia. Faagiproteiineja koodataan yhdessä bakteerin oman genomin mukana, joten isäntäsolu pysyy elossa. Faagin liittyminen isäntäsolun genomiin saattaa muunnella alkuperäisen infektion

aiheuttajan ominaisuuksia. Pahimmassa tapauksessa isäntäsoluista muodostuu jopa aiempaa patogeenisempi tai aggressiivisempi kanta. Tätä riskiä ei voida ottaa faagiterapiaa käytettäessä, joten lysogeenisiä faageja ei käytetä tutkimuksissa. (5)

Kuten aiemmin on jo mainittu, faageja on tutkittu hyvin laajalti niiden lääketieteellisesti kiinnostavien ominaisuuksiensa vuoksi. Aiemmissa tutkimuksissa on löydetty vain muutamia faageja *S. mutans* –bakteerille, ja näiden ominaisuuksia on tutkittu tähän mennessä hyvin vähän kliinisestä näkökulmasta. (11) Tekemäni uuden tutkimuksen avulla bakteriofageja etsitään lisää. Pyrkimyksenä on saada eristettyä faagiterapiaan soveltuvia lyyttisiä faageja, joita voitaisiin käyttää myös kliinisessä lääketieteessä. Mikäli *S. mutansia* vastaan saadaan kehitettyä kliinisesti toimiva bakteriofagi, on se mielestäni merkittävä löydös lääketieteellisesti. Faagien kasvatus lääketieteellisuuden käyttöön olisi hyvin kustannustehokasta johtuen niiden pienestä koosta sekä yksinkertaisesta lisääntymisestä (5).

Bakteriofagien lääkekäyttö on mielestäni erittäin mielenkiintoinen tutkimusaihe jo itsessään, sillä kuten Azeredo ja Sutherland tutkimuksessaan esittävät, antibioottien käyttö menettää funktionaalisuuttaan antibioottiresistenttien bakteerikantojen määrän kasvaessa. Tutkijakunnalla on kiire keksiä uusia keinoja muuntuvaa bakteerikantaa vastaan. Vaikka faagiterapia on monissa maissa vielä alkutekijöissä, on Itä-Euroopassa tutkittu aihetta jo useita kymmeniä vuosia myös ihmisillä. Kokeellisia ja tieteellisesti merkittäviä tutkimuksia on viimeisen kymmenen vuoden aikana julkaistu myös Yhdysvalloissa ja Britanniassa. (12) Ympäri maailmaa useissa lääkeyrityksissä ja tutkimuslaitoksissa on käynnissä tutkimuksia faagituotteisiin ja faagiterapiaan liittyen (10). Joissakin maissa on jo kaupallisia valmisteitakin myynnissä. Venäjällä myydään erilaisia faagituotteita suun patogeeneille, korvatulehduksiin, hengitystieinfektioihin ja muihin tulehdustiloihin.

Kuten kaikissa lääkehoidoissa on myös faagiterapiassa rajoitteita. Ensimmäinen haaste faagiterapiassa on tarpeeksi kattavan kirjaston kokoaminen sekä geenistöltään sopivien faagien löytäminen. Kirjaston monipuolisuus olisi avaintekijä nopean hoidon

turvaamiseksi infektiopotilaille. Koottuja ja puhdistettuja faageja täytyisi päästä testaamaan myös kliinisesti ennen kokoelmaan liittämistä, jotta saadaan käytännön kokemusta faagien toiminnasta. (12) Kliiniset testit ovat kuitenkin kalliita ja uskon, että siitä syystä rahoitusta pyritään käyttämään henkeä uhkaavien infektioiden tutkimukseen muita enemmän. Oman haasteensa tuovat myös suomalaistutkijoiden mukaan hidas hoidon aloitus sekä mahdollisesti kehittyvä faagiresistenssi (5). Faagiterapian vaikeus toksineja erittävillä soluilla on ilmeinen: kun bakteerisoluhajoaa, sen toksinit pääsevät elimistöön ja tämä voi olla kohtalokasta potilaalle (13). Tämä ongelma toistuu myös antibiooteissa, eikä ole ainoastaan faagiterapian haaste. Bakteriosidiset antibiootit vapauttavat myös toksineja hajottamistaan soluista.

Lisää tutkimusta tarvitaan vielä paljon ennen suurten massojen faagiterapiaa. Saatavilla oleva ja nykyiset tutkimusstandardit täyttävä informaatio on vielä tällä hetkellä hyvin tuoretta. Faagien vaikutuksista ihmisen mikrobiomiin kokonaisuutena sekä faagiterapian mahdollisista hoitomuodoista ja niiden kokonaisvaltaisista haitoista on saatava lisätutkimuksia ennen hoidon toteutusta. Faagien muuntuminen voi myös aiheuttaa haasteita, sillä jo nyt on löydetty faageja, joiden elinkierto on jotakin lyyttisen ja lysogeenisen kierron väliltä. (14)

3 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimukseni tehdään osana *Streptococcus mutans* bakteriofagitutkimusta. Tutkimuksen lopullisena pyrkimyksenä on saada tuotettua bakteriofagia faagiterapialaboratorion toimintaan. Faageja voidaan jalostaa kliiniseen käyttöön, mikäli tarkoitukseen sopivia lyyttisiä bakteriofageja löydetään. Kokonaisuudessaan Suomen faagiterapiahanke on vasta alkuvaiheessa työni aikana, joten tämän tutkimusosan tarkoituksena oli ensin löytää ja eristää *S. mutans* bakteerille spesifisiä bakteriofageja. Näyttemateriaaleina käytetään kaupallista bakteriofagiseosta sekä jätevesi- ja sylkinäytteitä. Mikäli bakteriofageja löydetään ja päästään tutkimaan, niin faagien soveltuvuus tutkimuksen tarkoitukseen ominaisuuksiensa puolesta selvitetään. On huomioitava, että geenitietokannoista löytyy ainoastaan muutamia faageja, joiden isäntäorganismiksi soveltuu *S. mutans* (11). Tutkimuksessa mahdollisesti löydettävät faagit ovat siis laajemmassakin mittakaavassa vielä hyvin heikosti tutkittavissa.

4 Tutkimusaineisto ja menetelmät

Tutkimusaineistona toimivat laboratoriokokeissa saadut tulokset. Tutkimuksen aiheeseen on tutustuttu ennalta aiempien faagitutkimusten, niistä kertovien artikkelien ja julkaisujen sekä väitöskirjojen avulla. Laboratoriotyövaiheen pohjatutkimusta bakteerien ja faagien kasvatusta varten ovat jo tehneet tutkimusryhmän muut jäsenet, etenkin laboratorioteknikko Henni Tuomala. Ennen bakteriofagitutkimuksen alkua on kerätty tietoa aiemmista tutkimuksista *S. mutans* -bakteerin kohdalta, jotta kasvatusolosuhteet sekä menetelmät on saatu optimoitua yleisiin laboratoriotyöohjeisiin.

4.1 Tutkimusaineisto

Tutkimuksen aineisto kerättiin suurelta osin laboratoriokokeista, jotka suoritettiin Helsingin yliopiston bakteriologian ja immunobiologian osaston laboratoriotiloissa, Mikael Skurnikin tutkimusryhmässä. Kaikki työvaiheet kirjoitettiin tarkasti muistiin laboratoriotyökirjaan, jotta jokainen työvaihe sekä siitä tulleet tulokset saatiin taltioitua. Tutkimustuloksista koottiin myöhemmin raportti, josta ilmenevät tarkasti laboratoriossa tehdyt kokeet ja niiden tulokset. Mikäli bakteriofageja löytyy tutkimuksen aikana, kerrotaan niiden ominaisuuksista erikseen. Samalla saadaan tietoa niiden sopivuudesta kliinisiin kokeisiin. Tulosten lisäksi käytettiin aihetta tukevana aineistona aiempia tutkimuksia, artikkeleita sekä väitöskirjoja.

Kirjallista aineistoa koottiin ennen tutkimuksen alkua. Laboratoriotyövaiheen aikana ilmenneiden ongelmien ratkaisemiseksi laajensin kirjallisen aineiston kattavuutta. Aiempia artikkeleita ja tutkimuksia aiheesta käytin myös saatujen tulosten vertailussa.

Näytemateriaalina tutkimuksessa toimivat jätevedet, valmiit kaupalliset faagiseokset sekä vapaaehtoisten koehenkilöiden sylkinäytteet. Jätevedet on kerätty sekä sairaalan jätevesistä ympäri Suomea että vedenpuhdistamoiden jätevesistä. Vapaaehtoisten koehenkilöiden sylkinäytteet kerättiin purskuttelemalla suussa steriiliä fysiologista suolaliuosta ja keräämällä sylkinäytteet yhteen steriiliin astiaan. Tutkimuksessa käytetyt isäntäkannat olivat pakastettuina yliopiston tiloissa ja löytyvät tietokannasta numerokoodien perusteella. Kappaleesta 5 löytyvässä taulukossa 2. on esitetty käytettyjen kantojen numerokoodit sekä alkuperä. Myös uusia *S. mutans* kantoja yritettiin eristää suoraan suusta otettavilla pyyhkäisynäytteillä, jotta saadaan tutkimuksen käyttöön tuoreempia ja mahdollisesti ajan saatossa muuntuneita kantoja.

Kun näytteitä kerätään, on aina mahdollista, että näytemateriaali pääsee saastumaan prosessin aikana. Bakteriofaginäytteiden saastuminen ei tässä tutkimuksessa merkittävästi muuta saatuja tutkimustuloksia. Kaikki käytettävät näytteet käsitellään bakteereita tuhoavilla aineilla sekä suodatetaan 0,2 µm suodattimella, jolloin mahdolliset

vieraat bakteerit eivät pääse pilaamaan lopullista faaginäytettä. Myöskään muiden faagien läsnäolo ei vaikuta lopulliseen tutkimus tulokseen. Lajilleen spesifiset faagit kuolevat ilman oikeanlaista isäntäsolua ja ainoastaan *S. mutansin* infektoivat bakteriofagit näkyvät kokeessa. Tutkimukseni näytemäärä sekä isäntäkantojen määrä oli hyvin pieni ja rajallinen. Tästä syystä tutkimuksesta saatuja tuloksia ei voida soveltaa yleisellä tasolla, eikä niitä voi ekstrapoloida tämän tutkimuksen ulkopuolelle.

4.2 Tutkimusmenetelmät

Tutkimusmenetelmien perustana toimii yleinen laboratoriokirja: Sambrook and Russel, Molecular Cloning A laboratory manual, third edition (15). Tutkimusmenetelmiä on sovellettu isäntänä toimivan bakteerikannan mukaisiksi. Tutkimuksessani käytetyt kasvatusmenetelmät perustuvat aiempiin tutkimuksiin *S. mutans* bakteerin kasvuolosuhteista. Tästä syystä kasvatus tapahtui optimaalisessa kasvulämpötilassa (37°C). (4) Muiden streptokokkien tapaan myös *S. mutans* viihtyy parhaiten vähähapellisissa oloissa ja siitä syystä kasvatus tapahtui hiilidioksidirikkaassa ympäristössä (CO₂-kaapissa).

Laboratoriossa käytetyt työohjeet löytyvät tutkielman liitteistä 1 ja 2. Työohjeita muokattiin vielä tutkimuksen alussa juuri tälle bakteerille optimaaliseksi, joten tässä lopullisessa työohjeessa on selkeästi merkittynä muutetut kohdat sulkeissa. Kaikki laboratoriotyöt tehtiin mahdollisimman steriilisti kontaminaatioiden välttämiseksi.

4.2.1 Työssä käytetyt reagenssit ja kasvatusalustat

Laboratoriotöissä käytetyt reagenssit sekä kasvatusalustat valmistin tutkimuksen aikana osana tutkimustyötä. Laboratoriossa valmistettujen kasvatusalustojen ja liuosten tarkat ohjeet löytyvät liitteestä 3. Ohjeissa noudatettiin kunkin valmistajan käyttöohjetta. Kasvatusalustoina käytettiin BHI-agaria, BHI-soft agaria sekä TSB-soft agaria. Käytetyt kasvatusalustat sekä liuokset autoklavoitiin ennen käyttöä steriilin lopputuloksen saamiseksi.

4.2.2 Näytemateriaalit

Näytteiden yhdistäminen tässä työssä oli mahdollista, sillä löydetyn faagin alkuperällä ei olisi tutkimuksen kannalta merkitystä. Ensimmäisessä työvaiheessa tutkittiin jätevesinäytteitä, jotka oli kerätty Helsingin Viikinmäen vedenpuhdistamolta (22.11.2017), Oulun WWTP:ltä (wastewater treatment plant) (21.11.2017) ja Turun WWTP:ltä (22.11.2017). Jätevedet sentrifugoitiin viiden minuutin ajan 3500 rpm ja suodatettiin 0,2 μm :n suodattimella. Lisäksi tutkittiin sairaalavesinäytteitä, jotka olivat kerätty syöpätautien klinikalta (15.4.2016), Porvoon ja Lohjan sairaaloista (13.4.2016) ja Peijaksen sairaalasta (14.4.2016). Sairaalavesinäyte esikäsiteltiin kuten jätevesinäytteen.

Kahden vesinäytteen lisäksi kolmantena näytemateriaalina käytettiin Fagodent-kaupallista faagiseosta. Fagodent on MikroMirin (Moskova) valmistama geelivalmiste, jonka markkinoidaan sisältävän faageja etenkin suun mikrobistoa vastaan. Koska Fagodent on geelimäisessä muodossa pumppupullossa, laimennettiin se näyteliuokseksi steriilillä SM-puskurilla.

Toisessa työvaiheessa haluttiin tutkia tuoreita faaginäytteitä. Sylkinäytteet koottiin vapaaehtoisilta henkilöiltä (17 hlöä), jotka ovat lähtöisin eri puolilta maailmaa. Sylkinäytteet kerättiin purskuttamalla n.10 ml:aa fysiologista suolaliuosta suussa. Näytteet yhdistettiin steriiliin astiaan, sentrifugoitiin ja suodatettiin epäpuhtauksien poistamiseksi 0,2 μm :n filterin läpi ennen tutkimista.

4.2.3 Bakteerien kasvatusolosuhteet

Työvaiheen alussa tutkittavina olevat bakteerikannat haettiin pakasteesta Bacto Brain Heart Infusion eli BHI-maljoille kasvamaan. Puhdasviljelmän kasvatus tapahtui 37 °C hiilidioksidikaapissa noin kahden vuorokauden ajan. *Streptococcus mutans* kasvaa laboratoriohenkilökunnan mukaan hitaasti. Tämä johti siihen, että työvaiheessa

bakteerien kasvatusaika pyrittiin maksimoimaan myös yön yli kasvatuksessa. Maljalta siirrostettiin yksittäinen bakteeripesäke viljelysauvalla 5 ml:aan BHI-liuosta. Bakteerien annettiin kasvaa yön yli lämpökaapin ravistelukasvatuksessa. Tutkimuksessa käytettiin faagien isäntäkantoina HUSLABista kerättyjä *S. mutans* -bakteereita sekä Hammaslääketieteenlaitokselta saatuja kantoja (6). Näitä oli yhteensä 49 kappaletta.

4.2.4 Faagien rikastaminen

Faagirikastus tehtiin lisäämällä 45 µl:aan yön yli kasvatettua bakteerisuspensiota 1,5 ml:aa tutkittavaa faaginäytettä sekä 4,5 ml:aa BHI-lientä steriiliin koeputkeen. Faageja rikastettiin 37 °C ravistelukasvatuksessa yön yli. Rikastuksessa käytettiin samaa bakteerikantaa kuin agarmaljalla faagititrauksessa. Rikastetusta faagiseoksesta tuhottiin elävät bakteerit lisäämällä kloroformia 150 µl ja lisäksi suodatettiin sentrifugoitu näyte 0,2 µm:n filtterin läpi. Faagiliuokseen lisättiin sakkaroosia, jonka loppukonsentraatio oli 8%. Sakkaroosi laimeni titrausta ennen tehdyn laimennussarjan mukana, eikä vaikuttanut isäntäkannan kasvuun maljalla. Tarkempi kuvaus faagien rikastamisesta sekä työohje löytyy liitteestä 1.

4.2.5 Faagititraus

Faagien titraukseen tarvittiin yön yli kasvatettua isäntäkantaa sekä rikastettua faagisuspensiota. Titrauksen tarkoituksena oli selvittää, löytyykö näytteestä isäntäbakteereita tuhoavaa faagia. Tästä syystä titrauksessa käytettiin niin sanottua Drop test -menetelmää. Puhtaiden BHI-maljojen päälle valettiin BHI soft agar kerros yön yli kasvatetusta bakteerisuspensiosta. Soft agar valmistettiin siten, että 3 ml:aan 55°C lämpötilaan temperoitua soft agaria lisättiin 200 µl:aa yön yli kasvatettua bakteerikasvustoa sekä 30 µl:aa 1 M CaCl₂. Soft agar valettiin tasaiseksi kerrokseksi BHI-pohjan päälle. Tasaisesta mikrobikasvustosta on helpompi tulkita faagititrauksen tulos.

Maljan jähmetyttyä voitiin suorittaa faagititraus. Tälle kaksikerrosmaljalle tiputettiin 10 µl:n pisara yön yli rikastettua faaginäytettä, josta kasvatusalustana toimineet bakteerit oli tuhottu ja suodatettu pois. Tutkittavien näytteiden lisäksi jokaiselle maljalle laitettiin viimeisenä myös negatiivinen kontrolli BHI-liuosta. Faagititrauksen avulla nähdään, muodostuuko maljan tasaiseen bakteerikasvustoon plakkeja eli kirkkaita alueita. Mikäli maljalla näkyy tällainen bakteerivapaa alue, voidaan päätellä näytteen sisältäneen faageja, jotka ovat infektoineet bakteerit alustalta. Näin havaitut faagit voitaisiin eristää maljalta, puhdistaa faagimaljojen avulla ja tutkia DNA-eristyksellä niiden sopivuus faagiterapiaan. Tarkempi kuvaus suoritetusta titrauksesta sekä työohje pisaramenetelmään löytyy liitteessä 2.

4.2.6 Uusien *Streptococcus mutans* -kantojen eristys

Tutkimuksessani pyrittiin eristämään lisää faagien isäntänä toimivia *S. mutans* kantoja. Tässä työvaiheessa bakteerien eristykseen käytettiin Hammaslääketieteenlaitokselta saatuja selektiivisiä alustoja: Ivoclar Vivadentin CRT[®] bacteria. Näitä alustoja käytetään normaalisti kariesbakteerien määrittämiseen potilaan sylkinäytteestä. Näytteet kerättiin kymmeneltä vapaaehtoiselta valmistajan käyttöohjeen mukaisesti. Syljen eritystä stimuloitiin parafiinin pureskelun avulla. Tämän jälkeen kerätty sylkinäyte pipetoitiin selektiivisen agarin pinnalle ja kasvatettiin ohjeen mukaisesti, kuitenkin lähes neljän vuorokauden inkubaatioajalla, 37°C:n lämpötilassa. Tarkempi kuvaus käyttöohjeesta löytyy liitteistä 4 ja 5. Näistä selektiivisistä agareista poimittiin tyypillisen näköisiä, pieniä ja harmaan värisiä pesäkkeitä verimaljoille yhteensä 14 pesäkettä. Maljojen annettiin kasvaa vuorokausi CO₂ -kaapissa 37°C:ssa ennen puhdasviljelmien tekoa. Puhdasviljelmät tehtiin BHI-agar maljoille, ja lähetettiin kasvatuksen jälkeen tyyppitettäväksi HUSLAB- laboratorioon.

Uusia bakteerikantoja etsittiin myös ottamalla pyyhkäisynäytteitä steriileillä pumpulipuikoilla vapaaehtoisten henkilöiden suun limakalvoilta ja hampaiden pinnoilta. Näytteet viljeltiin ensin verimaljoille. Tutkittavalle bakteerilajille tyypillisen näköisistä pesäkkeistä tehtiin vielä puhdasviljelmät kasvattamalla niitä selektiivisillä maljoilla. Selektiivisten maljojen pohjana käytettiin aikaisempia tutkimuksia *Streptococcus mutans*

spesifisistä kasvatusalustoista (16-18). Näiden tutkimusten pohjalta käytettiin basitrasiinia sisältäviä maljoja TYS20B, jotka sisälsivät 0,2U/ml basitrasiinia (17,18). Basitrasiinia käytetään kasvatusalustoissa estämään muiden suussa tavattujen streptokokkien kasvua (16). Maljoilta löydetty bakteerit tyypitettiin MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), time-of-flight (TOF)) massaspektrometrin avulla HUSLABin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa.

5 Tulokset

5.1 Faagieristysten tulokset

Faagititrauksia varten faaginäytteet rikastettiin yhdistelmiksi kootuissa bakteeripooleissa, jotka on esitetty alla olevassa taulukossa 1. Faagien rikastusnäyte titrattiin aina yhdelle bakteeripoolissa käytetylle *S. mutans* kannalle kerrallaan. Isäntäkannoista tehtiin erilliset puhdasviljelmät faagititrausta varten.

Taulukko 1. Poolatut kannat ja näissä pooleissa tehdyt faagirikastusten näytemateriaalit

	Yhdistetyt kannat	Näytteet
POOL 1	#6598, #6601, #6603	F, Sai, J
POOL 2	#6606, #6610, #6616	F, Sai, J
POOL 3	#6628, #6629, #6631, #6634	F, Sai, J
POOL 4	#6599, #6600, #6602, #6604	F
POOL 5	#6605, #6607, #6608, #6609	F
POOL 6	#6611, #6612, #6613, #6614	F
POOL 7	#6615, #6617, #6618, #6619	F
POOL 8	#6620, #6621, #6622, #6623	F
POOL 9	#6624, #6625, #6626, #6627	F, S
POOL 10	#6630, #6632, #6633, #6635	F, S
POOL 11	#6636, #6637, #6638, #6639	F, S
POOL 12	#6640, #6641, #6642, #6643	F, S
POOL 13	#6644, #6645, #6646	F, S
POOL 14	#6598, #6599, #6600, #6601, #6602	S
POOL 15	#6603, #6604, #6605, #6606, #6607	S
POOL 16	#6608, #6609, #6610, #6611, #6612	S
POOL 17	#6613, #6614, #6615, #6616, #6617	S
POOL 18	#6618, #6619, #6620, #6621, #6622	S

Näytteissä käytetyt lyhenteet: Fagodent (F), Sairaalavesinäytteet (Sai), Jätevesi (J) sekä sylki (S)

Laboratoriotutkimuksessa pyrittiin löytämään faageja jo valmiina olevista jätevesinäytteistä (J) sekä sairaalasta kerätyistä vesistä (Sai). Vesinäytteistä oli jo valmiiksi tehty yhdistelmä, eli pooli, jossa kaikki sairaalavedet sekä kaikki jätevedet oli

yhdistetty. Nämä faaginäytteet titrattiin ainoastaan kymmentä *S. mutans* -kantaa vastaan. Faagivalmiste fagodent (F) sekä vapaaehtoisilta kerätyt sylkinäytteet puolestaan titrattiin kaikkia laboratorion *S. mutans* -kantoja vastaan. Faagititrausten lopulliset tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Laboratoriokokeissa käytetyt *S. mutans* kannat ja faagititrauksesta saadut tulokset näyttemateriaaleittain

<i>S. mutans</i> KANTA	Näytteen alkuperä	Näyttemateriaali			
		Fagodent (F)	Jätevesimix (J)	Sairaalavesimix (Sai)	sylkinäytteet (S)
#6598	Grönroos	-	-	-	-
#6599	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6600	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6601	Grönroos	-	-	-	-
#6602	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6603	Grönroos	-	-	-	-
#6604	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6605	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6606	Grönroos	-	-	-	-
#6607	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6608	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6609	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6610	Grönroos	-	-	-	-
#6611	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6612	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6613	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6614	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6615	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6616	Grönroos	-	-	-	-
#6617	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6618	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6619	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6620	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6621	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6622	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6623	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6624	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6625	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6626	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-
#6627	Grönroos	-	e.t.	e.t.	-

<i>S. mutans</i> KANTA	Näytteen alkuperä	Näyttemateriaali			
		Fagodent (F)	Jätevesimix (J)	Sairaalavesimix (Sai)	sylkinäytteet (S)
#6628	HUSLAB	-	-	-	-
#6629	HUSLAB	-	-	-	-
#6630	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6631	HUSLAB	-	-	-	-
#6632	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6633	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6634	HUSLAB	-	-	-	-
#6635	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6636	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6637	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6638	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6639	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6640	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6641	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6642	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6643	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6644	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6645	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-
#6646	HUSLAB	-	e.t.	e.t.	-

- tarkoittaa että tulokset ovat olleet negatiiviset, e.t. = ei tehty.

Bakteerikasvusto oli kaksikerrosmaljoilla selkeää ja bakteerilajille tyypillistä. Tästä syystä voidaan olettaa, että kontaminaation mahdollisuus on ollut hyvin pieni. Toisissa maljoissa bakteerit kasvoivat selvästi paremmin, kuitenkin kaikissa maljoissa voitiin havaita silminnähden samaa bakteerikerros. Muutama kanta kasvoi selvästi huonommin. Näitä kantoja pyrittiin kasvattamaan ja kohentamaan muutamaan kertaan.

Kaikki sairaala- ja jätevesien faagititrauksista saadut tulokset olivat negatiivisia (-), kuten taulukosta 2 ilmenee. Maljoilla ei näkynyt faagien muodostamia plakkeja, joissa bakteerien määrä olisi vähentynyt ja maljalla näkyisi täten kirkkaampi kohta.

Kaikilla kannoilla tehtiin faagititraus käyttäen näyttemateriaalina MikroMirin faagivalmistetta, Fagodentia, sekä kerättyjä sylkinäytteitä. Tästäkään koejärjestelystä emme kuitenkaan saaneet positiivisia tuloksia. Näyttemateriaalit eivät siis sisältäneet faageja, jotka olisivat infektineet isäntäkantoina käytettyjä *S. mutanseja*.

5.2 Uusien *Streptococcus mutans* kantojen eristäminen

Vapaaehtoisilta näytteenantajilta etsittiin uusia *Streptococcus mutans* -bakteereita, koska faageja ei ollut aiemmissa tutkimuksissa löytynyt vanhoja *S. mutans* kantoja vastaan. Sylkinäytteet otettiin kymmeneltä vapaaehtoiselta selektiivisille agareille (CRT® bacteria). Kahdella agarilla oli isoja kellertäviä pesäkkeitä, eivätkä nämä olleet tyypillisiä *S. mutansille*. Kahdeksassa muussa agarissa oli pieniä harmaita pesäkkeitä, jotka ovat melko tyypillisen näköisiä ja kokoisia. Puhdasviljelmiin valittiin kaikista kymmenestä maljasta pesäkkeitä, yhteensä 14 kpl. Kaikki bakteerilajille tunnusomaisen näköiset puhdasviljelmät tyypitettiin MALDI-TOF laitteella, mutta *S. mutans* -bakteereita ei löytynyt.

Uusia *S. mutans* kantoja pyrittiin löytämään myös suoralla pyyhkäisynäytteellä suun limakalvoilta. Pyyhkäisynäytteet viljeltiin verimaljoilla. Tyypilliset pesäkkeet siirrostettiin selektiivisille maljoille, ja tyypitettiin MALDI-TOF massaspektrometrin avulla. Tyypityksessä löydettiin kymmenen uutta *S. mutans* kantaa. Tämä oli merkittävä tulos tutkimuksessani, sillä näitä isäntäkantoja voidaan hyödyntää jatkotutkimuksissa. Liitteessä 6 on esitetty MALDI-TOF laitteen analysoimat tulokset.

6 Pohdinta

Jäte- ja sairaalavedet ovat näytemateriaalina erittäin bakteeririkkaita, ja siitä syystä myös faagien löytyminen näistä olisi todennäköistä. Fagodent on yhdistelmävalmiste suun mikrobeja infektoivista faageista. Sen valmisteselosteessa mainitaan erikseen tuotteen sisältävän faageja *S. mutansia* vastaan. Tästä syystä Fagodentistä odotettiin positiivisia tuloksia tutkimuksessani. En kuitenkaan löytänyt tästä näytemateriaalista faageja, jotka infektoisivat yhtäkään isäntäkantoina toimineista *S. mutans* -bakteereista. Näytemateriaalina käytetyistä jätevesistä ja sairaalavesistä ei tehty kokeita jokaista pakastettua *S. mutans* kantaa vastaan. Tutkimuksen jatkuessa lopuillakin *S. mutans* kannoilla olisi hyvä tehdä faagititraus myös jäte- ja sairaalavesistä. Näin voidaan löytää uusia faageja.

Työohjeen toimivuus on todettu monilla muilla faageilla, joten menetelmässä tuskin esiintyy virheitä. Olosuhteet pyrittiin optimoimaan, jotta tutkitulla bakteerikannalla olisi parhaat mahdollisuudet kasvaa kasvatusalustoilla. Työvaiheessa saattaa aina tapahtua kontaminaatio, mutta tässä työssä sen merkitys oletettiin pieneksi. Työohjeen toimivuus yritettiin tarkistaa toisella streptokokkikannalla (*Streptococcus B/C* #6468), mutta Fagodentistä ei löytynyt tuollekaan streptokokille infektoivia faageja. Työn kannalta olisikin ollut erittäin hyödyllistä, jos olisimme saaneet positiivisen kontrollin tutkimuksiin. Mielestäni yhdenkin *S. mutansia* infektoivan faagin saantia olisi hyvä kartoittaa ennen tämän tutkimuksen jatkamista.

Työn aikana huomattiin, että kaksikerroksisen agarmaljan pinnalle pipetoitu faagirikastusnäyte ei imeytynyt agariin kunnolla. Näytepisara oli nesteinä agarin päällä vielä parin vuorokauden päästä. Inkubaatioaikaa kokeiltiin pidentää, mutta tällä ei ollut vaikutusta imeytymiseen. Päällimmäinen agar vaihdettiin huokoisempaan muotoon imeytymisen parantamiseksi. Agarin vaihtaminen vaikeutti selvästi tulosten tulkintaa sekä näytteiden käsittelyä. Tästä syystä kaikki kokeet lopulta tehtiin 0,4%:lla soft agarilla 0,3%:n sijaan. Imeytyvyysongelmaan kokeiltiin ratkaisuna myös TSB soft agaria, mutta näytteet jäivät yhä agarin pinnalle, eivätkä imeytyneet kunnolla. Soft agarilla ei pitäisi

olla bakteerien kasvun kannalta merkittävää eroa, joten voitiin vaihtaa BHI-agarpohja TSB:hen ilman tulosten vaarantumista. Bakteerikasvusto oli maljoilla yhtä selkeää kuin BHI-soft agarilla. On siis hiukan epäselvää, kuinka hyvin mahdolliset faagit lopulta pääsivät infektoimaan bakteerisoluja. Vaikka faagit eivät täysin imeytyisi agariin, silti agarin pinnalla olevissa soluissa tapahtuisi tuhoa ja plakin tulisi olla silmin havaittavissa muusta kasvustosta poikkeavana.

On todennäköistä löytää *S. mutansin* faageja sylkinäytteistä, sillä bakteeria tavataan yleisimmin juuri suussa. Faagien löytäminen on hyvin todennäköistä isäntäorganismien luonnollisesta ympäristöstä. Tutkimuksen tuloksena ei löydetty uusia bakteriofageja *S. mutansille*. Edellä mainittu tulos oli odotettavissa, sillä tälle bakteerille spesifisiä faageja on raportoitu hyvin vähän myös aiemmin tehdyissä tutkimuksissa. Toisaalta samasta kohteesta voidaan löytää usein monia faageja, ja niin olisi hyvin voinut tapahtua tässäkin tutkimuksessa. Nämä tulokset mielestäni vahvistavat aiempia tutkimuksia ja tuloksia, joiden perusteella *S. mutansin* faageja on joko hyvin vaikea löytää tai niitä ei ole useita.

Bakteerikannat muuntuvat ajan saatossa ja saattaa olla, että vanhat kannat eivät enää vastaa nykyisiä. Myös faagit voivat muuntautua isäntäsolujensa mukana. Tästä syystä on mahdollista, että näytteissä olleita faageja ei saatu kiinni kymmeniä vuosia sitten eristetyillä bakteerikannoilla. Sairaaloista saadut bakteerikannat ovat useimmiten veriviljelyistä löytyneitä. *S. mutansin* tyypillinen elinympäristö on kuitenkin suussa. Aiemmat tutkimukset asiasta osoittavat, että verenkiertoon levittäytynyt kanta saattaa jossakin määrin muuttua (19). Kysymys kuuluukin — toimivatko samat faagit veriolosuhteisiin adaptoituneissa isäntäkannoissa?

Seuraavissa tutkimuksissa olisi mielestäni erittäin hyvä nostaa näytemääriä huomattavasti, eristää lisää tuoreita *S. mutans* kantoja sekä tarttua tutkimukseni aikana havaittuihin ongelmiin mm. näytteen imeytymisen osalta. Tutkimuksessa päätettiin etsiä uusia *S. mutans* kantoja, jotta voidaan tutkia kaikkia saatuja faaginäytteitä myös tuoreempia *S. mutans* kantoja vastaan. Tämän tulisi mielestäni olla seuraava työvaihe tutkimuksen jatkuessa. Lisäksi olisi mielenkiintoista tutkia, löytyisikö faageja henkilöltä,

jonka suussa on paljon *S. mutansia*. Vai löytyisikö faageja nimenomaisesti potilaalta, jonka suussa ei juurikaan elä näitä bakteereita, vaan ne ovat faagien toimesta tuhoutuneet. Suun mikrobiomin ollessa hyvin monimuotoinen, olisi myös kiinnostavaa tutkia, palaavatko faagiterapialla tuhotut *S. mutansit* suun mikrobiomin osaksi, vai pysyvätkö ne poissa lopullisesti.

7 Johtopäätökset ja yhteenveto

Laboratoriokokeissa suurimmaksi käytännön ongelmaksi muodostui faaginäytteiden imeyttäminen maljalle muodostettuun soft agariin. Ongelmaa pyrittiin ratkaisemaan usealla keinolla, mutta vastausta ei tämän tutkimuksen aikana löytynyt. Tulosten kannalta tällä häiriötekijällä ei todennäköisesti ole merkitystä.

Tutkimuksessani etsittiin mahdollisia bakteriofageja perustettavaan faagiterapialaboratorioon. Uusia faageja ei saatu eristettyä hyvistä näytemateriaaleista huolimatta, joten tutkimusta edistettiin eristämällä uusia *S. mutans* kantoja. Uusia *S. mutans* -bakteereja saatiinkin eristettyä 10 uutta kantaa. Lisää tutkimuksia aiheen parissa tarvitaan vielä, ja suuremmat näytemäärät sekä positiivinen kontrolli juuri tälle bakteerille olisivat tarpeen. Mikäli faageja jatkotutkimuksissa löytyy, tulee niiden käyttökelpoisuus faagiterapian tarpeisiin selvittää.

Tämä tutkimus osoitti mielestäni sen, kuinka haastavaa bakteriofagien löytäminen voi olla. Näytemateriaalit ovat erittäin bakteeririkkaita, mutta faagien spesifisyyden vuoksi tuloksia ei kuitenkaan saatu. Bakteriofageja *S. mutansia* vastaan on yritetty aiemminkin eristää ja tulokset ovat jääneet vähäisiksi. On hyvin todennäköistä, että on olemassa useampia *S. mutansia* infektoivia faageja, joita ei vielä ole löydetty. Nyt kasvavan mielenkiinnon ja tutkimusten kohteena olevista faageista saadaan varmasti tulevaisuudessa paljon uutta tietoa. Tutkimukset faagiterapiaa varten jatkuvat vielä tässä tutkimusryhmässä.

8 Kiitokset

Suuret kiitokseni dosentti Saija Kiljuselle, jonka hyvässä ohjauksessa sain tehdä tutkielmani sekä laboratorioteknikko Henni Tuomalalle käytännön ohjeistuksesta. Haluan kiittää myös professori Mikael Skurnikia tästä mahdollisuudesta työskennellä osana tätä tutkimusryhmää. Kiitokseni myös HUSLABin kliinisen mikrobiologian laboratoriohenkilökunnalle näytteiden tyypittämisestä. Lisäksi haluan välittää kiitokseni yliopistonlehtori Lisa Grönroosille kaikesta kannustuksesta työn etenemistä kohtaan, sekä neuvoista ja avuista, jotka edesauttoivat tutkimustani eteenpäin.

Lähdeluettelo

- (1) Esberg A, Sheng N, Marell L, Claesson R, Persson K, Boren T, et al. *Streptococcus Mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. EBioMedicine 2017 October 01;24:205-215.
- (2) Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. Br Dent J 2016 November 18;221(10):657-666.
- (3) Tenovuo J. Kariksen ehkäisy nyt ja tulevaisuudessa. Duodecim 2002;16(118):1657-1662.
- (4) Grönroos L. Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition. Academic Dissertation 2000:7-29.
- (5) Skurnik M, Kiljunen S. Bakteriofagihoidon mahdollisuudet. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 2016 Jan 1;132(8):712-719.
- (6) Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin Production by *Streptococcus mutans* May Promote Transmission of Bacteria from Mother to Child. Infection and Immunity 1998 Jun 1;66(6):2595-2600.
- (7) Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunol Lett 2014 December 01;162(2 Pt A):22-38.
- (8) Banas JA, Drake DR. Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? BMC oral health 2018 Jul 31;18(1):129-8.
- (9) Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: A dental microbial infection. J Nat Sci Biol Med 2011 January 01;2(1):71-75.
- (10) Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. Curr Protein Pept Sci 2012 December 01;13(8):699-722.

- (11) Millardlab. Bacteriophage Genomes. 2018; Available at: <http://millardlab.org/bioinformatics/bacteriophage-genomes/>. Accessed 29.05., 2018.
- (12) Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 2008 August 01;9(4):261-266.
- (13) Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. *Curr Med Chem* 2015;22(14):1757-1773.
- (14) Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2017 August 06;8(3):162-173.
- (15) Sambrook and Russel. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, third edition . 3rd ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- (16) Gold OG, Jordan HV, van Houte J. Serological studies on *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.* 1973;18:1357-1364.
- (17) Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2002 March 01;47(1):21-26.
- (18) Momeni SS, Patrick P, Wiener HW, Cutter GR, Ruby JD, Cheon K, et al. Mutans streptococci enumeration and genotype selection using different bacitracin-containing media. *J Microbiol Methods* 2014 August 01;103:53-57.
- (19) Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *Journal of Medical Microbiology* 2006 Aug 1;55(8):1135-1140.

Liitteet

Faagien rikastus:

- 45 µl yön yli kasvatettua bakteerisuspensiota + 1,5 ml näytettä (jätevettä) + 4,5 ml BHI; kasvatus +37°C (hiilidioksidikaapissa) yy
- Voit poolata bakteerikantoja ja näytteitä, mutta suhteet pysyvät samana (esim. 3 x 0,5 ml vesinäytettä)
 - Bakteerien yhdistäminen
 - POOL 1
 - POOL 2
 - POOL 3 jne.
 - Näytteiden yhdistäminen
 - Sairaalavedet mix
 - Jätevedet mix
 - Fagodent (2 painallusta geeliä ja 1,5 ml SM-puskuria joka laimennetaan edelleen 10^{-1} ennen käyttöä)
 - Sylkinäytteet jne.
- Lis. 150 µl kloroformia, sekoita. Fuugaa solurippeet pohjaan (3500 rpm, 5-10 min) ja suodata näytteet (supernatanttia jää n. 5ml) 0,2 µm:n filtterin läpi (steriilin ruiskun avulla) koeputkeen, jossa on 1,2 ml 40% sakkaroosia.
- Etsi näytteistä faageja rikastukseen käytettyjä kantoja vastaan plakkimaljoilla

Titration of bacteriophages with double-layer method

Bacteriophage stocks can be titrated with double-layer (“soft agar”) method by two different ways:

A) “Classical” double-layer method

B) Drop test

Classical method gives more accurate result but requires more work and materials. In many cases, the drop test result is accurate enough. REMEMBER TO USE FILTER TIPS WHEN WORKING WITH PHAGES!

Drop test

1. Inoculate the host strain (*S. mutans*) in **1.3 ml BHI** (in 2 ml centrifuge tube) and grow at appropriate temperature (**37°C**) for **o/n**.
2. Temperate (and dry) appropriate number of BHI-agar plates. Mark the plates (date, Pool, F,S,J,NC,).
3. Melt soft-agar (BHI + 0.4% agar), divide in **3 ml** aliquots into small test tubes (glass tubes with aluminium covers). Temperate the soft-agar tubes at **55°C**.
4. Prepare a ten-fold dilution series of the bacteriophage stock in BHI. The volume of each dilution is 500 ml. A typical phage lysate needs **dilutions up to 10^{-1} (450 μ l BHI + 50 μ l phage)**
5. Prepare the double-layer plates: Into a temperate soft-agar tube, pipette **30 μ l CaCl_2 (1M)** and **200 ml** of bacterial suspension Vortex briefly and pour on a BHI plate. Mix carefully to spread the soft-agar evenly on the plate. **Work fast**, as the soft-agar hardens fast when poured on a plate.
6. Let the soft-agar harden for ~30 min at room temperature.
7. Pipette **10 μ l** drops of the phage dilutions (**10^{-1}**) on the soft-agar plates. Remember to mark the position of each dilution before pipetting! To each plate, pipette the negative control (**10 μ l BHI**) as the last sample (**Negative control**).
8. **Let dry** for ~1 h. Transfer the plates CAREFULLY to appropriate growth temperature, let grow o/n.
9. Estimate the titre. If you can count the number of individual plaques in some of the drops, you can calculate the titre from equation: no of plaques x dilution factor x 100.

Kasvatusalustat:

BHI-liemi

- 37 g Bacto Brain Heart Infusion -jauhetta
- 1 l MilliQ vettä

BHI-Agar (1,5%)

- 400 ml BHI-lientä
- 6 g agarjauhetta

BHI soft agar (0,4%)

- 80 ml BHI-lientä
- 0,32 g agarjauhetta

TSB-liemi

- 15 g Tryptone Soya Broth -jauhetta
- 0,5 l MilliQ vettä

TSB soft agar (0,4%)

- 80 ml TSB-lientä
- 0,32 g agarjauhetta

Puskurit ja liuokset:

Fysiologinen suolaliuos (0,9% NaCl)

- 38,5 ml NaCl 2M
- 0,5 l MilliQ vettä

SM puskuri

- 5,8g NaCl
- 2,0g MgSO₄ x 7 H₂O
- 16,7 ml Tris-HCl, pH 7,5
- 0,2 g gelatiinia
- 1000 ml:aan MilliQ vettä

CRT® bacteria Ivoclar Vivadent

Käyttöohjeet

Kuvaus

CRT bacteria käytetään määrittelemään *Streptococcus mutans*- ja *lactobacillimääriä* syljestä käyttämällä selektiivistä viljelyalustaa.

Indikaatiot

- In vitro diagnostiikka
- Kirkas agar-pinta: *lactobacillimäärän* määrittelyyn syljestä
- Sininen agar-pinta: *Streptococcus mutans* -määrän määrittelyyn syljestä tai plakista

Kontraindikaatio

Älä käytä CRT bacteria antibiootihoidon aikana. Antibiootihoidon jälkeen tulee odottaa vähintään 2 viikkoa ennen CRT bacteria -testin käyttöä. Antibakteerisen suuveden käytön jälkeen tulee kulua vähintään 12 tuntia ennen kuin CRT bacteria voidaan käyttää.

Käyttö

Menetelmä on tarkoitettu hammaslääkärin, hygienistin tai hammashoitajan käyttöön.

Työskentely vaihe vaiheelta

1. Anna potilaan stimuloida syljen eritystä pureskelemalla mukana toimitettavaa parafiinipalaa.
2. Kerää sylki sopivaan keräilyastiaan. **Vihje:** Syljen eritys, nopeus ja puskurikapasiteetti voidaan samanaikaisesti määritellä Ivoclar Vivadentin CRT bufferin avulla.
3. Poista agar-alusta testipurkista.
4. Aseta NaHCO₃ -tabletti purkin pohjalle.
5. Poista huolellisesti suojakalvot agar-pinnoilta. Älä kosketa agaria.
6. Käyttämällä pipettiä kastele agar-pinnat kokonaan syljellä. Varo naarmuttamasta agar-pintaa.
Vihje: Pidä agar-pinta hieman vinossa.
7. Valuta ylimääräsyylki pois.
8. Työnnä agar-pidike takaisin purkkiin ja sulje purkki tiiviisti.
9. Merkitse potilaan nimi ja päivämäärä pullon korkkiin vedenkestävällä kynällä.
10. Aseta testipurkki pystysuorassa asennossa inkubaattoriin, esim. Cultura/Ivoclar Vivadent ja inkuboi 37 °C /99 °F:ssa 48 tuntia.

11. Inkuboinnin jälkeen vertaile *Streptococcus mutans* ja *lactobacilliviljelmän* tiheyttä vastaaviin mukana toimitettaviin vertailukuviin.

Vihje: Pidä viljelyalustaa hieman vinossa valolähteen alla helpottaaksesi tutkimusta.

Mukaeltu työskentelyohje

Vähän mukaeltuna testimenetelmän avulla voidaan määritellä streptococcus mutans - määrä plakista. Poista plakkia pehmeällä harjalla. Vie plakki siniselle agarille naarmuttamatta sen pintaa. Samanaikaisesti voidaan tutkia 4 näytettä. Näytteen valmistus ja inkubointi tehdään kuten on kuvattu käyttöohjeen vaihe vaiheelta selosteessa. Tämän tutkimuksen avulla voidaan tehdä johtopäätös ainoastaan siitä, onko streptococcus mutansia läsnä vai ei.

Annostele pieni määrä vettä NaHCO₃ tabletille ellei se ole kostunut riittävästi syljestä.

Arviointi

Löydökset 10⁵ CFU tai enemmän *lactobacilleja* ja *Streptococcus mutansia* per 1 ml sylkeä osoittavat suurta kariesriskiä.

Huomio

Testipurkin jääminen inkubaattoriin ylimääräiseksi päiväksi tai kahdeksi ei vaikuta CFU-määrään.

Hävittäminen

- Älä käytä uusia agar-alustoja, joissa näyttää olevan bakteereja.
- Ennen agar-alustan hävittämistä desinfioi se sopivalla aineella tai autoklavoi se autoklaavipakkauksessa.

Säilytys

- Säilytä CRT bacteria jääkaapissa (2–8 °C /36–46 °F).
- Älä jäädytä materiaalia.
- Vältä lämpötilavaihteluja.
- Suojaa valolta.
- Säilyvyys: katso pakkausten säilyvyyspäiväyksiä.
- Älä käytä CRT bacteria käyttöpäivän jälkeen.

Säilytettävä lasten ulottumattomissa.

Vain hammaslääketieteelliseen käyttöön.

Tiedot päivitetty

05/2003

Ivoclar Vivadent AG

FL-9494 Schaan/Liechtenstein

Tämä tuote on tarkoitettu ainoastaan hammaslääketieteelliseen käyttöön. Tuotetta tulee käsitellä tarkasti käyttöohjeita noudattaen. Valmistaja ei vastaa vahingoista, jotka johtuvat siitä, että käyttöohjeita tai ohjeiden mukaista soveltamisalaa ei noudateta. Tuotteen soveltuvuuden testaaminen muuhun kuin ohjeissa mainittuun tarkoitukseen on käyttäjän vastuulla. Kuvaukset ja tiedot eivät takaa ominaisuuksia eivätkä ole sitovia.

MALDI-TOF tulokset

VITEK® MS Review

 VITEK® MS Review

To be reviewed Reviewed

Search Criteria

Operator: All Bench name: All Setup Date: From 8/27/18 To 8/30/18

Operator Bench name Setup Date

All All From 8/27/18 To 8/30/18 Search

Number of Isolates: 21

List of reviewed results

	Patient ID	Patient Name	Accession ID	Organism Name	Confidence Value	Confidence Level	Review Status
			18AJ			All	All
040	1.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00012-1	Streptococcus intermedius	99.9	Reviewed
040	5.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00013-1	Streptococcus sanguinis	99.9	Reviewed
050	21.2	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00014-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	7.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00015-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	6.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00016-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
040	9.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00017-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
040	6.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00018-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
040	7.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00019-1	LIHAN PIENI PES.		Discarded
040	14.2	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00020-1	Rothia dentocariosa	99.9	Reviewed
040	14.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00021-1	Rothia dentocariosa	99.9	Reviewed
040	15.2	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00022-1	Rothia dentocariosa	99.9	Reviewed
040	2.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00023-1	LIHAN PIENI PES.		Discarded
040	19.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00024-1	Rothia dentocariosa	99.9	Reviewed
040	10.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00025-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	21.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00026-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	20.2	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00027-1	Streptococcus intermedius	99.9	Reviewed
040	15.2	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00028-1	Rothia dentocariosa	99.9	Reviewed
050	8.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00029-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	9.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00030-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	10.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00031-1	Streptococcus mutans	99.9	Reviewed
050	5.1	010102-975D	LABTUTKIMUS,NAYTE	18AJ00032-1	Streptococcus sanguinis	99.9	Reviewed



Page 1 of 1



Number of rows per page: 99

Key: Refresh Review selected results Discard Add comment Print